



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CURSO DE BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

FERNANDA STHÉFANIE MEDEIROS DE ARAÚJO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE
Psidium guineense (Myrtaceae) CONTRA CEPAS DE *Candida*
glabrata e *Candida parapsilosis***

PATOS - PB

2023

FERNANDA STHÉFANIE MEDEIROS DE ARAÚJO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE
Psidium guineense (Myrtaceae) CONTRA CEPAS DE *Candida*
glabrata e *Candida parapsilosis***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

PATOS - PB

2023

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado Bibliotecas – SISTEMOTECA/UFCG**

A663a

Araújo, Fernanda Sthéfanie Medeiros de

Atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense* (Myrtaceae) contra cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. / Fernanda Sthéfanie Medeiros de Araújo. – Patos, 2023.
28f.

Orientador: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Odontologia.

1. Farmacologia. 2. Fitoterapia. 3. Odontologia. I. Oliveira Filho, Abrahão Alves de, *orient.* II. Título.

CDU 616.314:633.88

Bibliotecário-documentalista: Bárbara Costa – CRB 15/806

FERNANDA STHÉFANIE MEDEIROS DE ARAÚJO

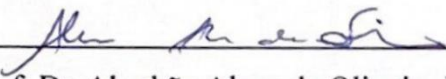
**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE
Psidium guineense (Myrtaceae) CONTRA CEPAS DE *Candida*
glabrata e *Candida parapsilosis***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Aprovada em: 28/09/23

BANCA EXAMINADORA

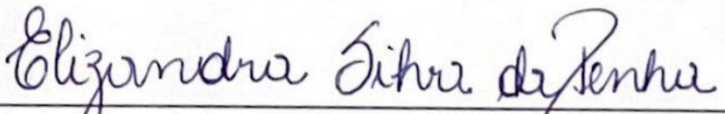


Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho - Orientador
Universidade Federal de Campina Grande



Prof.ª. Dra. Gymenna Maria Tenório Gunes – 1º membro

Universidade Federal de Campina Grande



Prof.ª. Dra. Elizandra da Silva Penha – 2º membro

Universidade Federal de Campina Grande

Primordialmente dedico a conclusão deste trabalho e do curso de odontologia à Deus, por sempre me mostrar que tenho força e capacidade de fazer coisas que nunca imaginei. Além disso, agradeço a Ele também por me orientar a seguir caminhos que são preciosos e importantes. À minha família que sempre foi meu porto seguro e meus maiores investidores/incentivadores. Especialmente aos meus pais, Mércia Cirne e Ancelmo Dias, à minha irmã, Letícia Yang, à minha tia, Izabel Estelita e ao meu namorado, Vinícius Rodrigues, por sempre terem acreditado e compartilhado desse sonho que agora se concretiza, me guardando sempre em suas orações.

Agradecimentos

Não poderia iniciar esse texto a não ser agradecendo à Deus, pois é graças a Ele que estou aqui. Sempre senti que tenho alguém guiando meus passos e na escolha do curso não foi diferente, a odontologia não era o meu sonho, pelo menos não que eu soubesse, mas Deus é tão perfeito e sabe tanto mais sobre nós do que nós mesmos que me mostrou que esse era o caminho certo pra mim. Me mostrou onde eu deveria estar e por onde iria me sentir feliz e completa. Nesses quase 5 anos que se passaram eu estaria mentindo se dissesse que não enfrentei dificuldades e dúvidas, mas Deus sempre esteve presente em cada momento difícil e me mostrou que nada daquilo era maior do que o sonho que eu estava construindo intimamente no meu coração. E é graças a todas as dificuldades e percalços enfrentados ao longo dessa trajetória que sou quem sou hoje, tanto profissional quanto pessoal.

É importante que eu destaque o quanto Deus sempre foi bondoso e generoso comigo, primeiramente pela família maravilhosa que me agraciou, eles que sempre me mostraram a importância do estudo e sobretudo a importância de ser uma boa pessoa. Que sempre foram meus maiores incentivadores e admiradores, eles que vibraram comigo desde a aprovação na faculdade a cada mini vitória alcançada ao longo desses anos. É por eles que eu tenho tamanha gratidão que jamais poderá ser mensurada e nem transcrita em um papel.

Aos meus pais, Ancelmo Dias e Mércia Cirne, por toda educação, dedicação e por encherem meu coração de amor, esperança e o conforto que por diversas vezes precisei para vencer esta etapa. Eles que sempre cuidaram tão bem de mim e que são minha motivação diária. Espero enchê-los sempre de orgulho pela pessoa que sou e pela profissional que serei.

À minha tia, Izabel Estelita, que nunca mediu esforços para que eu realizasse os meus objetivos. Por todo apoio econômico e emocional a mim dado e a confiança depositada em mim, em meu futuro e na busca pelo meu sonho são coisas que nunca conseguirei devolver. Agradeço pelo amor, pelas palavras de carinho e orgulho que me deram forças para prosseguir.

À minha irmã, Letícia, que sempre foi minha melhor amiga dessa vida e que sempre esteve presente em todos os momentos, me dando forças e dizendo que se orgulhava de mim, mal sabendo ela que eu que tenho um orgulho imenso por vê-la crescer e se tornar cada vez mais uma mulher digna de admiração e respeito.

Ao meu namorado, Vinícius Rodrigues, que está presente na minha vida há muitos anos e sempre acreditou no meu potencial e nas minhas escolhas. Me dando um apoio que foi imprescindível ao longo da caminhada. Saber que estamos vencendo mais uma etapa juntos me traz ainda mais motivação e fé que o futuro que nos aguarda é o mais lindo possível.

Também mostrando o amor e zelo de Deus por mim, não poderia deixar de citar as pessoas maravilhosas que ganhei ao longo dessa trajetória. Em especial, minha dupla da graduação, Lara Mayanne, tê-la ao meu lado tornou o processo mais fácil e fez com que várias situações que seriam recheadas de ansiedade (como os primeiros procedimentos realizados) se tornassem mais leves. Agradeço pela parceria e, principalmente, pela amizade e cuidado ao longo desses anos. Você foi sem dúvidas um grande presente de Deus pra mim.

Aos meus amigos, Agabio, Lucas, Carla, Pedro, Emanuel, Brunna, Laura, Virna, Letícia que estiveram comigo desde o P1 e tantos outros que estreitei laços ao longo dos anos na minha jornada patoense. Impossível citar um por um, mas quero de maneira simplória dizer obrigada! Que a vida seja tão gentil com vocês quanto foram comigo.

Aos meus amigos, que não viveram essa jornada fisicamente, mas sempre demonstraram apoio e presença. Levo no coração todos vocês que me viram tentando ser “alguém na vida” e estão hoje me vendo chegando um pouco mais perto. Obrigada pelas palavras de consolo, o ombro amigo e acima de tudo o apoio. Guardo todos no meu coração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho, que me deu essa oportunidade incrível de vivenciar o laboratório e a pesquisa, gratidão pelos ensinamentos passados com dedicação e exímio, e também por toda confiança em mim depositada. Sou imensamente grata pela oportunidade e por todas as portas abertas durante a graduação.

Aos meus queridos mestres Elizandra Penha, Gymenna Maria, Camila Machado, Fátima Roneiva, Karina Rolim, Rosana Araújo, João Nilton. Cresci ouvindo sobre o respeito à que deveríamos ter para com os nossos professores e aprendi a tê-lo durante toda minha vida. Mas hoje entendo a magnitude desta sublime profissão. Ensinar não é fácil, educar menos ainda, mas ser o melhor no que faz é para poucos. E vocês fazem desta profissão árdua um trabalho suave porque o fazem com amor e carinho. Obrigada a todos pela grande e proveitosa contribuição. Aos demais professores não citados anteriormente, minha eterna gratidão por todos os conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

À Liga Acadêmica de Fitoterapia Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), por toda a troca de conhecimento e experiência. Agradeço a todos os membros pela ajuda durante o desenvolvimento do meu projeto e por despertar em mim a paixão pela pesquisa.

Aos funcionários, talvez os maiores acompanhadores- e até orientadores- das lutas dos alunos. Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar e a informar. A vitória dessa formação com certeza também é de vocês.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram na minha vida acadêmica. Estar realizando esse sonho é um mérito não somente meu, como de todos vocês.

“Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.”

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl G. Jung

RESUMO

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista causada por microrganismos do gênero *Candida*, a mais comum da cavidade oral. Os fungos *Candida* estão presentes na microbiota oral saudável, entretanto condições podem torná-los patogênicos. Diversos medicamentos antifúngicos vêm sendo utilizados para o tratamento da candidíase, tais como, antifúngicos azóis (cetoconazol, fluconazol) e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina B), no entanto, diversos desafios têm sido observados quanto à eficácia do tratamento medicamentoso como: a resistência das cepas fúngicas aos antimicóticos, adesão do paciente, efeitos adversos dos medicamentos sintéticos. Assim, o uso de plantas medicinais apresenta-se como uma alternativa viável e promissora para a descoberta de novos agentes fitofármacos de grande potencial biológico. Embasado em estudos da literatura que evidenciam as características físico-químicas e etnofarmacológicas das espécies de plantas medicinais, esta pesquisa tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense* (*Myrtaceae*). O estudo se dá através da realização de ensaios *in vitro* onde foi utilizado como substância-teste o extrato hexânico de *Psidium guineense* frente as espécies fúngicas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* previamente identificadas e mantidas em meios de cultura de ágar Sabouraud dextrose – ASD e caldo Sabouraud dextrose – CSD. Ademais, para realização do controle positivo foi empregado a nistatina como antifúngico padrão. Por conseguinte, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hexânico de *Psidium guineense*. A leitura da CIM foi feita em 48 horas. Como resultado desse estudo, foi possível identificar que para ambas as cepas da espécie do gênero *Candida*, o extrato hexânico de *Psidium guineense* apresentou valor de CIM superior a 1024 µg/mL. Sendo assim, observa-se que a substância teste em questão apresenta-se ineficaz contra as cepas de fungos testadas por meio da metodologia utilizada, no entanto necessita de mais estudos para verificar o potencial antifúngico contra outras cepas de fungos.

Palavras-chaves: Farmacologia; Fitoterapia; Odontologia.

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by microorganisms of the genus *Candida*, the most common in the oral cavity. *Candida* fungi are present in the healthy oral microbiota, but conditions can make them pathogenic. Various antifungal drugs have been used to treat candidiasis, such as azole antifungals (ketoconazole, fluconazole) and polyene antifungals (nystatin, amphotericin B). However, several challenges have been observed with regard to the efficacy of drug treatment, such as resistance of fungal strains to antimycotics, patient compliance and adverse effects of synthetic drugs. Thus, the use of medicinal plants is a viable and promising alternative for the discovery of new phytopharmaceutical agents with great biological potential. Based on studies in the literature showing the physicochemical and ethnopharmacological characteristics of medicinal plant species, the aim of this research is to evaluate the antifungal activity of the hexanic extract of *Psidium guineense* (*Myrtaceae*). The study was carried out through *in vitro* tests in which the hexanic extract of *Psidium guineense* was used as a test substance against the fungal species *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*, which had been previously identified and maintained in Sabouraud dextrose agar (SDA) and Sabouraud dextrose broth (SSB) culture media. In addition, nystatin was used as the standard antifungal agent for the positive control. The broth microdilution technique was then used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the hexanic extract of *Psidium guineense*. The MIC was read after 48 hours. As a result of this study, it was possible to identify that for both strains of the *Candida* genus, the hexanic extract of *Psidium guineense* showed a MIC value of more than 1024 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. This means that the test substance in question is ineffective against the strains of fungi tested using the methodology used, but further studies are needed to verify its antifungal potential against other strains of fungi.

Keywords: Pharmacology; Phytotherapy; Dentistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato de <i>Psidium guineense</i> contra cepas de <i>C. glabrata</i>	24
Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato de <i>Psidium guineense</i> contra cepas de <i>C. Parapsilosis</i>	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

CSTR – Centro de Saúde e Tecnologia Rural

DMSO – Dimetilsulfóxido

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

OMS – Organização Mundial da Saúde

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

UACB – Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
4 METODOLOGIA E VIABILIDADE	22
4.1 ENSAIO <i>IN VITRO</i>	22
4.1.1 SUBSTÂNCIA TESTE	22
4.1.2 ESPÉCIES FÚNGICAS	22
4.1.3 MEIOS DE CULTURA.....	22
4.1.4 FÁRMACO ANTIFÚNGICO	22
4.1.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Os fungos *Candida* vivem em relação comensal inofensiva com o hospedeiro e podem colonizar diferentes habitats como mucosas e pele dos seres humanos, sendo o trato gastrointestinal, desde a boca até o reto, o principal sítio de colonização. Estão presentes na microbiota oral saudável, entretando condições podem favorecer seu crescimento e torná-los patogênicos, tais como: redução do fluxo salivar, deficiência vitamínica, fumo, terapias com antibióticos de largo espectro e presença de doenças imunossupressoras (Brandão *et al.*, 2021).

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista causada por microorganismos do gênero *Candida*, o qual apresenta cerca de 200 espécies distintas de leveduras, sendo os principais agentes de acometimento humano as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. A espécie *C. albicans* é a mais incidente em infecções pelo gênero. No entanto, o número de relatos de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. Glabrata* é crescente (Nunes, 2017).

Para que consigam se proliferar e infectar, os microorganismos precisam ultrapassar/superar a imunidade inata e adquirida, além de barreiras naturais do hospedeiro: mecânica (pele), bioquímicas e físico-químicas (pH extremos e produção de muco). Os fatores de virulência do gênero *Candida* são inúmeros: secreção de enzimas hidrolíticas, expressão de adesinas e invasinas, tigmotropismo, bomba de efluxo, formação de biofilme. Destacando-se a morfologia celular dessas espécies como um dos principais, visto que a formação de hifas, está diretamente relacionada a capacidade de invasão tecidual, enquanto a forma leveduriforme está associada a adesão a célula do hospedeiro (Rocha *et al.*, 2021).

A transição da *Candida* de uma relação comensal inofensiva com o hospedeiro para um estado patogênico parasitário é dependente de uma variação de fatores. Podem ser eles locais como má higiene e uso prolongado de próteses, tabagismo, disfunção salivar ou sistêmicos, como discrasias sanguíneas, deficiências nutricionais e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A candidíase oral está fortemente relacionada à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Relatos epidemiológicos enfatizam a prevalência da candidíase em pacientes HIV positivos e sua importância como marcador da progressão da doença e preditivo para o aumento da imunodepressão (Vila *et al.*, 2020).

A infecção fúngica causada pela *Candida* também é muito recorrente em pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos, visto que as drogas quimioterápicas causam imunodepressão no paciente. A candidíase apresenta-se sob diferentes formas: a pseudomembranosa, caracterizada pela formação de placa esbranquiçada removida à raspagem; a forma crônica hiperplásica, que exibe o aspecto de placa esbranquiçada não destacável a raspagem; a candidíase eritematosa, caracterizada pela presença de eritema local ou difuso; e a queilite angular, constituída por lesões eritematosas e/ou ulceradas nas comissuras labiais (Pereti; Maza, 2021).

Para tratar as lesões causadas pela candidíase é necessário inicialmente identificar fatores predisponentes e corrigí-los, exemplo de pacientes usuários de prótese, orientar sobre a higiene e a não utilizá-la continuamente. Na ausência de fatores óbvios, ou frente a casos de lesões muito disseminadas, indica-se avaliação sistêmica por meio de hemograma, glicemia em jejum e anti-HIV, a fim de descartar quadros de anemia e imunossupressão, associada ou não ao HIV. É importante salientar que vários medicamentos sintéticos estão sendo desenvolvidos para tratar a candidíase oral, como antissépticos à base de iodoquinol, derivados sulfamídicos, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina e anfotericina B). Além desses, destacam-se ainda os antifúngicos azóis que são agentes do imidazol (cetoconazol e clotrimazol) e os agentes triazóis (fluconazol e itraconazol). Entretanto, o uso indiscriminado de antifúngicos tem gerado uma resistência maior de diversos microrganismos, fazendo com que os profissionais busquem outras alternativas efetivas, como a fitoterapia e a terapia fotodinâmica (Borges *et al.*, 2021).

A utilização da fitoterapia contra infecções fúngicas se mostrou uma alternativa promissora ao longo dos anos, devido à sua ação antimicrobiana e antiinflamatória, menor toxicidade, redução no desenvolvimento de cepas resistentes, biocompatibilidade e baixo custo. Entretanto, essa utilização deve estar embasada em estudos científicos, sua posologia e modo de administração (Uguña; León; Chacha, 2017).

Em meio as diversas plantas de uso medicinal destaca-se a família *Myrtaceae* que compreende diversos gêneros e espécies de árvores e arbustos, distribuídos em todos os domínios fitogeográficos brasileiros. Nesta família está presente o gênero *Psidium* e a espécie *Psidium guineense*, conhecida popularmente como araçá-do-campo. Estudos da atividade biológica desta planta têm demonstrado propriedades antimicrobianas de extratos de folhas e o potencial antioxidante dos frutos. Além das propriedades do óleo essencial das folhas de *P. guineense*, antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativas e antimicobacterianas (Nascimento *et al.*, 2017).

Assim, baseada na necessidade de um maior conhecimento científico sobre a fitoterapia,

principalmente relacionada ao tratamento da candidíase oral, esse trabalho vai investigar a possível atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense* (*myrtaceae*) contra cepas do gênero *Candida*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense* (*Myrtaceae*).

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade antifúngica do extrato de *Psidium guineense* sobre cepas de *Candida glabrata*;
- Investigar a atividade inibitória do extrato de *Psidium guineense* para cepas de *Candida parapsilosis*;
- Comparar o efeito antifúngico do extrato de *Psidium guineense* frente às diferentes cepas de fungos testadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos é causada por fungos oportunistas. A *Candida* é um exemplo, é fungo diplóide e polimórfico, que está presente nos humanos como um organismo comensal sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais à sua saúde, entretando quando esse equilíbrio é rompido torna-se responsável pelo desenvolvimento de diversas patologias. Podem colonizar e causar distúrbios na cavidade oral, tratos gastrointestinal, respiratório e urinário, circulação sanguínea (De Rossi *et al.*, 2011).

A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, Sua etiopatogenia é relacionada as leveduras do gênero *Candida*, constituinte da microflora bucal residente, torna-se patogênica na presença de fatores predisponentes, como por exemplo: hipossalivação, uso de próteses dentárias, diabetes mellitus, uso prolongado de antibióticos e corticóides. Considera-se a *Candida albicans* a espécie de maior patogenicidade devido sua predominância em isolados fúngicos. Ainda, outras espécies inseridas no gênero *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*) também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase. Os pacientes imunocomprometidos possuem uma maior probabilidade de serem acometidos por infecções fúngicas, como os indivíduos portadores de leucemia, linfoma e síndrome da imunodeficiência adquirida (Lima *et al.*, 2006).

Inclusive, a candidíase oral é um importante indicador prognóstico da progressão da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) para o quadro de AIDS. Além disso, como em um círculo vicioso, a candidíase oral aumenta a prevalência de imunossupressão no paciente, e tem sido relacionada com a disfunção imune e redução na quantidade de linfócitos CD4+ (Miziara; Lima; De La Cortina, 2004).

A candidíase apresenta-se sob diferentes formas: a pseudomembranosa, a forma crônica hiperplásica, a candidíase eritematosa e a queilite angular. Pode acometer pacientes de todas as idades, em especial indivíduos nos extremos da idade (crianças ou idosos) por apresentar o sistema imunológico comprometido ou pouco desenvolvido como os neonatos. As principais regiões de acometimento na cavidade oral são de mucosa jugal, mucosa labial, palato e dorso da língua (Gama *et al.*, 2018).

Historicamente, a espécie de *Candida glabrata* tem sido considerada relativamente não patogênica e pertencente da flora normal de indivíduos saudáveis, raramente causando infecção grave em humanos. No entanto, após o uso generalizado e crescente de terapia imunossupressora juntamente com terapia antifúngica de amplo espectro, a frequência de infecções mucosas e sistêmicas causadas por *C. glabrata* aumentou significativamente, sendo

a segunda ou terceira causa mais comum de candidíase depois da *C. albicans*. As infecções por *C. glabrata* são difíceis de tratar e muitas vezes são resistentes a muitos agentes antifúngicos azólicos, especialmente fluconazol (Fidel Jr.; Vazquez; Sobel, 1999).

A via usual da *Candida glabrata* para atingir a corrente sanguínea é através da quebra de barreiras naturais, como o uso de cateteres, trauma ou cirurgia. Entretanto, a suscetibilidade à doença aumenta devido a certas condições, como AIDS e tuberculose, uso de imunossupressores e medicamentos contra o câncer, antibioticoterapia e hospitalização prolongadas. Muitos fatores facilitam a patogenicidade das espécies de *Candida*, como a secreção de enzimas, adesão celular, evasão de defesa do hospedeiro e formação de biofilme. Entretanto, diferentemente da *Candida albicans*, que precisa estar na forma de hifas para invasão dos tecidos do hospedeiro, não se observa esse mesmo mecanismo na espécie *C. glabrata*, uma vez que esta espécie é incapaz de formação de hifas. A abordagem de tratamento para infecções por *C. glabrata* é desafiadora devido ao conhecimento limitado de sua patogenicidade, a reduzida suscetibilidade aos antifúngicos e as escolhas limitadas de agentes antifúngicos eficazes (Hassan; Shu Yih; Lung Than, 2021).

Em concordância, a espécie *Candida parapsilosis* também foi considerada não patogênica a primeira instância, no entanto, o aumento do uso de dispositivos médicos, nutrição parenteral e infecções nosocomiais tornou a *C. parapsilosis* uma das espécies fúngicas mais críticas que causam infecções da corrente sanguínea que são de particular relevância em recém-nascidos criticamente doentes e pacientes imunocomprometidos. Devido à formação de biofilmes, o uso de cateteres e outros dispositivos médicos aumentam o risco de infecção, pois as células embebidas em biofilmes apresentam menor suscetibilidade aos medicamentos. Essa capacidade de formação de biofilmes está relacionada à capacidade de formar pseudo-hifas, bem como a alteração concomitante nos níveis de expressão de adesinas localizadas na parede celular. É importante ressaltar que a suscetibilidade a agentes antifúngicos à base de azóis comumente usados em biofilmes fúngicos em dispositivos médicos pode ser fortemente reduzida (Gómez-Molero *et al.*, 2021).

Progressivamente a proporção de infecções por *Candida albicans* está diminuindo, enquanto infecções por outros patógenos oportunistas, como *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, estão mostrando uma tendência crescente em prevalência e muitas vezes mostram resistência a vários medicamentos antifúngicos. As drogas antifúngicas são atualmente o método mais eficaz e utilizado para o tratamento de infecções por *Candida*, apesar de já ser observada grande resistência entre algumas espécies e a ocorrência de reações adversas devido o potencial tóxico de algumas drogas. São utilizadas drogas como: anfotericina

B especialmente para infecções fúngicas graves, no entanto, tem vários efeitos colaterais óbvios, especialmente nefrotoxicidade e nistatina. Também são utilizados os azólicos de primeira geração, como fluconazol, itraconazol e voriconazol; as equinocandinas, como a micafungina, entre outros que estão sob estudo (Qin *et al.* 2021).

Em relação a resistência dos fungos às terapias, a explicação pode ser o fato de existirem poucos medicamentos antifúngicos disponíveis para tratamento das infecções, o que aumenta a chance de desenvolvimento de resistência à terapia padrão. Outro fator é o fato do tratamento tópico resultar em melhora passageira e interrupção do tratamento pelo paciente. Devido à ocorrência de resistência aos antifúngicos convencionais, influenciada pelo uso indiscriminado, além dos seus efeitos colaterais e interações medicamentosas, há a necessidade que novas modalidades terapêuticas sejam utilizadas, sendo produtos de origem vegetal muito estudados devido à baixa toxicidade relacionada ao uso da medicina tradicional (Teodoro *et al.* 2020).

Os extratos vegetais são ferramentas comuns em indústrias farmacêuticas e de perfumarias, constituindo manipulações concentradas que podem estar na forma líquida, viscosa ou em pó e que são obtidos a partir das partes secas da planta através de maceração, percolação, entre outros métodos. As moléculas isoladas de produtos naturais podem contribuir para o desenvolvimento de novos fitofármacos e para a produção de novas formulações, com menos efeitos colaterais, amplo espectro de ação e menor custo. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Freire *et al.*, 2016).

As terapias complementares são práticas terapêuticas que possibilitam a complementação da prática alopática tradicional. No Brasil essa prática vem sendo sedimentada e estruturada ao longo do tempo, justificada por práticas culturais, tradicionalidade de uso e a vasta biodiversidade encontrada no território. Cerca de 82% da população brasileira faz uso de preparações e produtos à base de plantas medicinais. Esse dado corrobora com a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) que aponta que de 70% a 90% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, faz uso de práticas tradicionais, como a fitoterapia (Soares *et al.*, 2020).

O ecossistema brasileiro é considerado uma área prioritária para conservação da biodiversidade global, por apresentar uma impressionante fauna e flora, especialmente altas concentrações de plantas endêmicas. Entre a diversidade de espécies vegetais endêmicas, destacamos aquelas pertencentes à família *Myrtaceae*. A importância ecológica dessa família nos diferentes biomas do Brasil foi confirmada em vários aspectos (Oliveira *et al.*, 2017).

A família *Myrtaceae* compreende 132 gêneros e 5671 espécies de árvores e arbustos. É uma das principais famílias da flora brasileira, sendo encontradas aproximadamente 1000 espécies em diferentes biomas do território brasileiro. Tem importância econômica no uso de espécies na indústria de especiarias, na indústria madeireira e para produção de papel indústria farmacêutica e cosmética (Kauffmann; Ethur, 2016).

Dentre as espécies que compõem a família *Myrtaceae*, destaca-se o araçá (*P. guineense*), uma espécie frutífera rica em minerais e elementos funcionais, como ácido ascórbico e compostos fenólicos. As raízes de *P. guineense* são tidas como diuréticas e antidiarréicas e suas cascas podem ser utilizadas para aplicação em curtumes, devido ao elevado teor de taninos. Tem despertado interesse dos diferentes nichos, tanto pela população em geral pelo sabor do seu fruto, quanto pela indústria farmacêutica, por apresentar ampla riqueza genética e por apresentar propriedades antioxidantes, diurética, antidiarreica e antimicrobiana (Rodrigues *et al.*, 2014).

Dados da literatura científica reforçam o potencial biológico do araçá (*P. guineense*), uma vez que importantes atividades farmacológicas foram atribuídas aos frutos e folhas dessa espécie como: antioxidante, antimicrobiano e antiproliferativo. Porém, existe na literatura uma escassez de informações referentes a atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense* frente as cepas do gênero *Candida* em infecções da cavidade oral.

4 METODOLOGIA E VIABILIDADE

4.1 ENSAIO *IN VITRO*

4.1.1 SUBSTÂNCIA TESTE

Para o ensaio foi utilizado o extrato hexânico das folhas de *Psidium guineense*, que foram cedidos pela equipe da Prof^a. Dra. Yanna Carolina Ferreira Teles, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O extrato foi conservado em frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração. As emulsões do extrato nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução do ensaio. Em um tubo de ensaio esterilizado, foi adicionado 60.000 µg do extrato, 0,15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,06 mL de Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril. A mistura foi agitada por 5 minutos em aparelho Vortex (Fanem), obtendo uma emulsão com concentração de 20.000 µg/mL do extrato, 5% de DMSO e 2% de Tween 80. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foi obtida a concentração desejada do extrato. A pesquisa seguiu as normas do CGEN- Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, cadastrado na plataforma SISGEN.

4.1.2 ESPÉCIES FÚNGICAS

Foram utilizadas cepas de *Candida glabrata* (LM06, LM 17, LM 116, LM302) e cepas de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019, LM 04, LM 09, LM 14 e LM 02), disponíveis no Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB)/CSTR/UFCG.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek, Greger, 2000).

4.1.3 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os meios ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; e caldo Sabouraud dextrose - CSD (Difco Lab., USA) para os ensaios *in vitro*; preparados conforme as instruções do fabricante.

4.1.4 FÁRMACO ANTIFÚNGICO

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

4.1.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima do extrato de *Psidium guineense* foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek, Greger, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifíciada placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina nas concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50 µL de Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a leitura. A CIM para cada extrato e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é avaliada através da menor concentração da substância teste necessária para inibir o crescimento do microrganismo exposto, esse valor é a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Nesse estudo, foram realizados testes de microdiluição em caldo e observou-se que a CIM do extrato hexânico de *Psidium guineense* (araçá) contra as diferentes cepas de *Candida Glabrata* e *Candida Parapsilosis* foi superior a 1024 µg/mL para todas as cepas testadas. Conforme apresentado nas tabelas 1 e 2;

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato hexânico de *Psidium guineense* contra diferentes cepas de *Candida glabrata*.

CIM	Cepas de <i>C. glabrata</i>			
	LM 06	LM 17	LM 116	LM 302
1024 µg/mL	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+

Não teve inibição (-)
Teve inibição (+)

Fonte: Autor.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do extrato hexânico de *Psidium guineense* contra diferentes cepas de *Candida parapsilosis*.

CIM	Cepas de <i>C. parapsilosis</i>				
	ATCC 22019	LM 04	LM 09	LM 14	LM 02
1024 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-
512 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-
256 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-
128 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-
64 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-
32 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+

Não teve inibição (-)
Teve inibição (+)

Fonte: Autor.

De acordo com Sartoratto et al. (2004) para uma atividade antimicrobiana de produtos de origem natural ser considerada como forte, estes devem possuir a CIM de até 500 $\mu\text{g/mL}$, moderada para CIM de 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ e fraca para CIM acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$. Com isso, diante dos resultados obtidos pela técnica de microdiluição em caldo não foi possível classificar o efeito antifúngico do extrato em estudo, visto que os valores da CIM foram maiores que 1024 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas analisadas.

Além disso, também é possível observar nas tabelas que houve crescimento das cepas nos poços de controle negativo confirmando a viabilidade das cepas fúngicas utilizadas para os testes. Já nos poços da placa referentes ao controle positivo foi possível verificar a inibição do crescimento fúngico, demonstrando que as cepas testadas são sensíveis ao antifúngico controle utilizado, neste caso a nistatina.

Divergente do estudo em questão, Nascimento et al. (2017) demonstraram o potencial efetivo do óleo essencial das folhas de *P. guineense* como sendo antioxidante, antiproliferativo, anti-inflamatório e antimicrobiano contra bactérias. Estes autores sugeriram que a predominância do espatulenol, correspondendo a mais de 80% da sua composição, é

parcialmente responsável pelos efeitos terapêuticos associados à espécie.

Apesar dos resultados desse trabalho terem se mostrados ineficazes contra as cepas do gênero *Candida*, estudos como os de Fernandes et al. (2021) associaram a presença principalmente de flavonoides e taninos no extrato aquoso de frutos e folhas de *P. guineense* como eficazes contra cepas de *Streptococcus mutans*. Além desse Macedo et al. (2021) analisaram a atividade antimicrobiana dessa espécie contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, que possuem histórico de resistência a antibióticos, e demonstraram que os extratos aquoso e de acetato de etila apresentaram um forte efeito antimicrobiano contra cepas de *S. aureus* (CIM = 250 –500 µg/mL) e *K. pneumoniae* (CIM = 64 µg/mL).

6. CONCLUSÃO

Com essa pesquisa, chegou-se a conclusão que o extrato hexânico de *Psidium guineense* não apresentou atividade antifúngica frente as cepas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, por meio da técnica utilizada, apresentando uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) superior a 1024 µg/mL, sendo necessário maiores estudos para descartar o potencial antifúngico do extrato hexânico de *Psidium guineense* contra outras cepas do gênero *Candida*.

REFERÊNCIAS

- BORGES, C. A. *et al.* Diagnóstico e formas de tratamento da candidíase oral: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, Minas Gerais, v. 10, n. 15, p. 1-9, nov./2021.
- BRANDÃO, H. N. *et al.* Fitoterapia no tratamento da candidíase oral: Um protocolo de revisão de escopo. **Research, Society and Development**, Paraíba, v. 10, n. 7, p. 1-7, jun./2021.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- DE ROSSI, T. *et al.* Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, pág. 15-28, 2011.
- FERNANDES, T.G. *et al.* In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (swartz) in combinatiomn with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Sci. World J** 2021.
- FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, New Orleans, v. 12, n. 1, p. 80-96, jan./1999.
- FREIRE, J. C. P. *et al.* Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre candidose oral: uma revisão de literatura. **Salusvita**, 35, n. 4, p. 537-546, 2016.
- GAMA, M. R. D. *et al.* Candidíase pseudomembranosa oral em neonato: relato de caso. **Revista da AcBO**, v. 7, n. 2, 2018.
- GÓMEZ-MOLERO, E. *et al.* *Candida parapsilosis* colony morphotype forecasts biofilm formation of clinical isolates. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 33, 2021.
- HADACEK F, GREGER H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v.11, p. 137-147, jun. 2000
- HASSAN, Yahaya; CHEW, Shu Yih; THAN, Leslie Thian Lung. *Candida glabrata*: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 667, 2021.
- KAUFFMANN, C.; ETHUR, E. M. Potencialidade de espécies da família myrtaceae como fonte para obtenção de novos candidatos a fármacos para o tratamento de leishmanioses. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 13, n. 3, 2016.
- LIMA, I. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 197-201, 2006.
- MACEDO, J. G. F. *et al.* Therapeutic indications, chemical composition and biological activity of native Brazilian species from *Psidium* genus (Myrtaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114-248, 2021.

MIZIARA, I. D.; LIMA, A. S.; CORTINA, R. A. C. Candidíase oral e leucoplasia pilosa como marcadores de progressão da infecção pelo HIV em pacientes brasileiros. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 3, p. 310-314, 2004.

NASCIMENTO, K. F. D. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v. 210, n. 2, p. 351-358, ago./2017.

NUNES, M. A. F. Análise da sensibilidade para diagnóstico molecular de candidíase. 2017.

OLIVEIRA, E. F. *et al.* Leaf morphology and venation of *Psidium* species from the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 407-413, 2017.

PERETI, J. M.; MAZA, L. Ocorrência de candidíase oral em pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 195-198, ago./2021.

QIN, J. *et al.* Clinical efficacy and safety of antifungal drugs for the treatment of *Candida* parapsilosis infections: a systematic review and network meta-analysis. **Journal of medical microbiology**, v. 70, n. 10, p. 001434, 2021.

ROCHA, W. R. V. D. *et al.* Gênero *Candida*: Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 1-14, abr./2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14283/12866>. Acesso em: 8 mai. 2022.

RODRIGUES, C. G. *et al.* Atividade antibacteriana de taninos de *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 35, pág. 1095-1100, 2014.

SARTORATTO A, MACHADO AL, DELARMELINA C, FIGUEIRA GM, DUARTE MC, REHDER VL. Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. **Braz. J. Microbiol.** Dez. 2004; 35: p. 275-280

SOARES, A. J. S. *et al.* Potencialidades da prática da atenção farmacêutica no uso de fitoterápicos e plantas medicinais. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, 2021.

TEODORO, P. D. S. *et al.* O uso da terapia fotodinâmica como método alternativo de tratamento da candidíase oral. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 14-23, fev./2020.

UGUÑA, K. B. C.; LEÓN, P. P.; CHACHA, A. F. Efecto antifúngico de diferentes concentraciones del extracto de *Uncaria Tomentosa* sobre *Candida albicans*: Estudio in vitro. **Revista Odontología**, v. 19, n. 2, p. 30-39, 2017.

VILA, T. *et al.* Oral candidiasis: A disease of opportunity. **Journal of Fungi**, 6, n. 1, p. 15, 2020.